

Приказом Росздравнадзора
от _____ 201__ г. № _____

Первый заместитель
генерального директора
ФГУП «НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России

« 31 » 03 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

СПЕКТР – 4

Тест-система иммуноферментная для подтверждения положительных результатов при выявлении антител к вирусу гепатита С

Набор реагентов Спектр-4 Тест-система иммуноферментная для подтверждения положительных результатов при выявлении антител к вирусу гепатита С включает следующие реагенты для проведения непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА):

- **ИММУНОСОРБЕНТ** – синтетические и рекомбинантные антигены, соответствующие участкам белков, кодируемых структурной (core) и неструктурной (NS3, NS4, NS5) областями генома вируса гепатита С (ВГС), отдельно сорбированные в лунках 96-луночного разборного планшета для ИФА.
- **КОНЬЮГАТ** (x51 концентрат) – моноклональные антитела мыши против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Прозрачная жидкость сине-зеленого цвета.
- **K⁺** - контрольный положительный образец – донорская плазма, содержащая антитела к вирусу гепатита С (анти-ВГС), не содержащая поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к ВИЧ-1,2, инактивированная, содержит краситель-фуксин кислый. Прозрачная жидкость красного цвета.

- К⁻ - контрольный отрицательный образец - донорская плазма, не содержащая HBsAg, антитела к ВГС и ВИЧ-1,2, инактивированная. Прозрачная жидкость желтого цвета.
- РИП – разбавитель исследуемых проб, содержащий индикаторный краситель-бромтимоловый синий водорастворимый. Прозрачная жидкость сине-фиолетового цвета.
- ФСР-Т (x25 концентрат) – фосфатно-солевой буферный раствор с твином-80. Прозрачная или опалесцирующая жидкость, бесцветная или желтоватого цвета, допускается выпадение кристаллического осадка.
- ЦБ – 0,05 М цитратный буферный раствор, содержащий водорода перекись. Прозрачная бесцветная жидкость.
- ТМБ (x5 концентрат) – раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в димексиде. Прозрачная бесцветная жидкость.
- СТОП-РЕАГЕНТ - 1 М раствор кислоты серной. Прозрачная бесцветная жидкость.

Набор рассчитан на проведение 48 определений, включая контрольные.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для подтверждения положительных результатов иммуноферментного анализа (ИФА) при выявлении антител к вирусу гепатита С в сыворотке (плазме) крови человека, препаратах крови.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Меры предосторожности

Входящие в набор реагентов контрольные образцы инактивированы. Однако исследуемая сыворотка и плазма крови людей, а также растворы, оборудование и материалы, находящиеся с ними в контакте представляют собой потенциально инфекционный материал, и обращаться с ним следует с соблюдением мер предосторожности: при работе использовать резиновые перчатки; оборудование, находившееся в контакте с биологическими

образцами и реагентами, дезинфицировать до и после работы спирта этилового раствором 70 %; все использованные материалы обеззараживать водорода перекиси раствором 6 % или хлорамина Б раствором 3 % в течение 2 ч, или автоклавированием при $(2,0 \pm 0,1)$ кгс/см² $((0,20 \pm 0,01)$ МПа), температуре (132 ± 2) °С в течение 60 мин; при работе с растворами ТМБ и кислоты серной не использовать пипетки с металлическими частями и избегать попадания этих растворов на кожный покров. Загрязненные участки кожи и слизистые оболочки обильно промывать водой.

Дополнительные материалы и оборудование

Материалы: ванночки для реагентов; вата гигроскопичная; вода дистиллированная или деионизированная; крышки или липкая плёнка для закрывания планшетов; мерный стакан или цилиндр вместимостью 1000 мл; наконечники одноразовые вместимостью 0,5-300 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл, 2-10 мл; перчатки резиновые; растворы для обеззараживания: хлорамина Б раствор 3%, водорода перекиси раствор 6 %, спирта этилового раствор 70 %; флаконы стеклянные или пластиковые вместимостью 10, 20 мл с резиновыми или пластиковыми пробками.

Оборудование: анализатор иммуноферментный с тест-фильтром 450 нм и референс-фильтром 620-680 нм; дозаторы пипеточные для внесения жидкостей: 1-канальные с переменным объёмом от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл, от 1 до 5 мл, от 2 до 10 мл и 8-канальные с переменным объёмом от 50 до 300 мкл; контейнеры для обеззараживания твёрдых и жидких отходов; промыватель планшетов автоматический; термостат с диапазоном рабочих температур от 28 до 55 °С.

Требования к образцам

В качестве исследуемых образцов используют сыворотку (плазму) крови человека, препараты крови. Исследуемые образцы транспортировать и хранить при температуре от 2 до 8 °С. Если образцы сыворотки или плазмы не могут быть использованы в течение 3 сут, заморозить их и хранить при температуре не выше минус 18 °С не более 1 года. Замороженные образцы

перед использованием разморозить на воздухе при комнатной температуре. Перед использованием образцы тщательно перемешать путем встряхивания. Повторное замораживание не допускается.

Не рекомендуется использование образцов с выраженным гемолизом, хилезных, с бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, так как могут быть получены ложноположительные или ложноотрицательные результаты ИФА.

Лиофилизированные препараты крови перед исследованием растворить в дистиллированной воде (если иное не указано в ФСП на препарат) и довести объем до номинального.

Перед исследованием все препараты иммуноглобулинов дополнительно разводить рабочим раствором ФСР-Т до конечной концентрации белка:

- 10 ± 1 мг/мл (для иммуноглобулинов внутривенного введения),
- $5 \pm 0,25$ мг/мл (для иммуноглобулинов внутримышечного введения),
- $5 \pm 0,4$ мг/мл (для иммуноглобулинов энтерального применения).

Растворенные препараты крови хранению не подлежат.

Подготовка реагентов для ИФА

Все реагенты перед использованием выдержать не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочих растворов концентрированных реагентов.

Рабочие растворы готовить в зависимости от количества используемых стрипов иммуносорбента в соответствии с таблицей 1.

В случае выпадения кристаллического осадка солей в ФСР-Т (x25 концентрат), прогреть его при 37 °С до полного растворения осадка. Рабочий раствор ФСР-Т хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут. Рабочий раствор конъюгата и субстратный раствор готовить непосредственно перед использованием. Не хранить. К⁺, К⁻, РИП и стоп-реагент готовы к использованию.

После отбора необходимого количества оставшиеся реагенты и неиспользованные стрипы плотно закрыть и хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение срока годности.

Таблица 1

Разведение концентрированных реагентов

Количество стрипов	Рабочий раствор ФСР-Т		Рабочий раствор конъюгата		Субстратный раствор	
	ФСР-Т x25 концентрат, мл	Вода дистиллированная, мл	Конъюгат x51 концентрат, мл	Рабочий раствор ФСР-Т, мл	ТМБ x5 концентрат, мл	ЦБ, мл
1	2,5	60	0,02	1	0,2	0,8
2	5,0	120	0,04	2	0,4	1,6
3	7,5	180	0,06	3	0,6	2,4
4	10,0	240	0,08	4	0,8	3,2
5	12,5	300	0,10	5	1,0	4,0
6	15,0	360	0,12	6	1,2	4,8
7	17,5	420	0,14	7	1,4	5,6
8	20,0	480	0,16	8	1,6	6,4
9	22,5	540	0,18	9	1,8	7,2
10	25,0	600	0,20	10	2,0	8,0
11	27,5	660	0,22	11	2,2	8,8
12	30,0	720	0,24	12	2,4	9,6

Проведение ИФА

Иммуносорбент перед использованием промыть 2 раза, заполняя лунки до краев и удаляя рабочий раствор ФСР-Т. Промытый иммуносорбент хранению не подлежит!

Во все лунки планшета внести по 100 мкл РИП, добавить по 20 мкл контрольных или исследуемых образцов (см. *Схему постановки ИФА*) и перемешать пипетированием. При этом цвет раствора в лунках (за исключением K^+) должен измениться с сине-фиолетового на сине-зеленый.

Схема постановки ИФА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Core	K^+	№ 1	№ 3	№ 5	№ 7	№ 9	№ 11	№ 13	№ 15	№ 17	№ 19	№ 21
B NS3	K^+	№ 1	№ 3	№ 5	№ 7	№ 9	№ 11	№ 13	№ 15	№ 17	№ 19	№ 21
C NS4	K^+	№ 1	№ 3	№ 5	№ 7	№ 9	№ 11	№ 13	№ 15	№ 17	№ 19	№ 21
D NS5	K^+	№ 1	№ 3	№ 5	№ 7	№ 9	№ 11	№ 13	№ 15	№ 17	№ 19	№ 21
E Core	K^-	№ 2	№ 4	№ 6	№ 8	№ 10	№ 12	№ 14	№ 16	№ 18	№ 20	№ 22
F NS3	K^-	№ 2	№ 4	№ 6	№ 8	№ 10	№ 12	№ 14	№ 16	№ 18	№ 20	№ 22
G NS4	K^-	№ 2	№ 4	№ 6	№ 8	№ 10	№ 12	№ 14	№ 16	№ 18	№ 20	№ 22
H NS5	K^-	№ 2	№ 4	№ 6	№ 8	№ 10	№ 12	№ 14	№ 16	№ 18	№ 20	№ 22

Исследуемые образцы

Иммуносорбент закрыть крышкой или заклеить плёнкой и выдержать при температуре 37 °С в течение 30-40 мин, затем промыть 5 раз как описано выше.

Во все лунки планшета внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, закрыть крышкой или заклеить плёнкой и выдержать при температуре 37 °С в течение 30-40 мин, затем промыть 5 раз как описано выше.

Во все лунки иммуносорбента внести по 100 мкл субстратного раствора, выдержать при температуре от 18 до 25 °С в течение 10-15 мин в защищённом от света месте, затем добавить по 50 мкл стоп-реагента и не позднее чем через 5 мин учесть результаты ИФА.

Учет и интерпретация результатов

Провести измерение оптической плотности (ОП) раствора в лунках иммуносорбента с помощью анализатора иммуноферментного, установив "0" прибора по воздуху при двух длинах волн. Тест-фильтр - 450 нм, референс-фильтр - 620-680 нм. Допускается одноволновое измерение при 450 нм.

Результаты оценивать, если значения ОП в лунках с К⁻ (ОП К⁻) по каждому из четырех антигенов (Core, NS3, NS4, NS5) не превышают 0,150, в лунках с К⁺ составляют не менее 1,000.

Учет результатов проводить отдельно по каждому антигену, сравнивая ОП с соответствующим значением ОП К⁻. Результаты анализа считать положительными, если значение ОП образца в лунке хотя бы с одним из сорбированных антигенов превышает критическое значение (ОП_{крит.}), рассчитываемое для каждого антигена по формуле:

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП К}^{-} + 0,150$$

Результаты анализа считать отрицательными, если значения ОП образца в лунках со всеми антигенами не превышает ОП_{крит.}

ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов включает: ИММУНОСОРБЕНТ – 2 планшета; КОНЪЮГАТ (х51 концентрат) - 1 фл./проб, 0,5 мл; К⁺ - 1 фл./проб, 1 мл; К⁻ - 1 фл./проб,

1 мл; РИП - 1 фл., 20 мл; ФСР-Т (х25 концентрат) - 2 фл. по 30 мл; ЦБ - 2 фл. по 10 мл; ТМБ (х5 концентрат) - 1 фл., 5 мл; СТОП-РЕАГЕНТ - 1 фл., 10 мл; упакованные в картонную коробку, в которую вложена инструкция по применению.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Хранить в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте. Замораживание не допускается.

Транспортировать в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 2 недель. Замораживание не допускается.

Срок годности – 6 месяцев. По истечению срока годности набор реагентов использованию не подлежит.

Условия отпуска.

Для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество тест-системы направлять в адрес предприятия изготовителя ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России, 115088, г. Москва, ул. 1-ая Дубровская, д. 15, тел. (495) 710-37-87.

Адрес производства: Россия, 603950, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, ул. Грузинская, 44, тел. (831) 434-42-77.

Ответственный за производство:

Директор
филиала ФГУП «НПО «Микроген»
Минздравсоцразвития России
в г. Н.Новгород



В.И. Поляков

« 18 » 03 2011 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»
д.м.н, профессор



В.В. Долгов

« 18 » 03 2011 г.

**ПЕРВЫЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬ
ГЕНЕРАЛЬНОГО ДИРЕКТОРА
ФГУП «НАУКА И МИКРОЭЛЕКТРОНИКА»
МИНДРА «РАЗВИТИЯ РОССИИ»
ПО ДОВ.**

